

Original article

Effect and safety of Echigoshirayukidake (*Basidiomycetes-X*) on fatty liver: Stratified randomized, double-blind, parallel-group comparison study and safety evaluation study

Yoshikazu Yonei¹⁾, Masayuki Yagi¹⁾, Wakako Takabe¹⁾, Koji Nishikawa²⁾, Yoshiaki Tsuno²⁾

1) Anti-Aging Medical Research Center and Glycative Stress Research Center,
Faculty of Life and Medical Sciences, Doshisha University, Kyoto, Japan

2) Mycology Techno Co., Ltd, Niigata, Japan

Glycative Stress Research 2019; 6 (4): 258-269

(c) Society for Glycative Stress Research

(原著論文：日本語翻訳版)

越後白雪茸 (*Basidiomycetes-X*) の脂肪肝改善作用と安全性：層別無作為化二重盲検並行群間比較試験および安全性評価試験

米井嘉一¹⁾、八木雅之¹⁾、高部稚子¹⁾、西川浩司²⁾、津野芳彰²⁾

1) 同志社大学大学院生命医科学研究科アンチエイジングリサーチセンター／糖化ストレス研究センター

2) マイコロジーテクノ株式会社

抄録

【目的】 越後白雪茸 (*Basidiomycetes-X*: BX) 乾燥粉末の脂肪肝に対する有効性と安全性を検証するために層別無作為化二重盲検並行群間比較試験および安全性評価試験を施行した。

【方法】 健康な男女 114 名を体格指数 (body mass index: BMI)、体脂肪率、コリンエステラーゼ (ChE)、トリグリセリド (TG) によるランキング付けを行い、上位 48 名 (男性: 24 名、女性: 24 名) を被験者とし、BX-L 群: BX 乾燥粉末 30 mg 配合食品 (越後白雪茸由来ピロールアルカロイド 14.4 μg)、BX-N 群: BX 乾燥粉末 300 mg 配合食品 (越後白雪茸由来ピロールアルカロイド 144 μg)、BX-5 群: BX 乾燥粉末 1,500 mg 配合食品 (越後白雪茸由来ピロールアルカロイド 720 μg)、対照群: BX を含まない食品をそれぞれ 6 週間摂取する 4 群 (各 12 名) に分けた。試験前、摂取 6 週後、12 週後に抗加齢 QOL 共通問診票、理学的検査、血液生化学検査を施行した。本試験は倫理審査の承認の元に施行した。

連絡先: 教授 米井嘉一
同志社大学大学院生命医科学研究科アンチエイジングリサーチセンター/
糖化ストレス研究センター
〒610-0394 京都府京田辺市多々羅都谷 1-3
電話 & FAX: 0774-65-6394 メール: yyonei@mail.doshisha.ac.jp
共著者: 八木雅之 myagi@mail.doshisha.ac.jp、高部稚子 wtakabe@mail.doshisha.ac.jp、
西川浩司 nishikawa@mycologytechno.com、津野芳彰 tsuno@mycologytechno.com

Glycative Stress Research 2019; 6 (4): 258-269
本論文を引用する際はこちらを引用してください。
(c) Society for Glycative Stress Research

【結果】 BX-N 群では、AST が摂取前 (24.8 ± 1.5 U/L) に比較して摂取 12 週後 (22.0 ± 1.7 U/L) で有意に減少 ($p = 0.015$)、LDH が摂取前 (195.3 ± 10.9 U/L) に比較して摂取 6 週後 (185.1 ± 9.3 U/L)、12 週後 (173.8 ± 10.5 U/L) で有意に減少した ($p = 0.007$ 、 $p < 0.001$)。群間比較解析では BX-N 群 AST は対照群に比べて有意に改善した ($p = 0.031$)。抗加齢 QOL 共通問診票スコアおよび γ -GTP、ALP、ChE には群間有意差は認められなかった。BX-5 群においても BX に起因する有害事象は認められなかった。

【結論】 BX は食経験も豊富なキノコであり、高用量 (常用の 5 倍) を摂取しても安全性が確認された。BX 乾燥粉末は脂肪肝による肝機能障害改善に対する機能性食品として期待できる。

KEY WORDS: 越後白雪茸 (*Basidiomycetes-X*)、脂肪肝、肝機能、抗酸化物質

はじめに

越後白雪茸は、1994 年に新潟県魚沼地区で発見された希少な新種の食用茸である。京都菌類研究所山中勝次博士により、担子器を形成しない新種の担子菌類 (茸) であることが明らかにされ、越後白雪茸 (学名: *Basidiomycetes-X*: BX) として、独立行政法人製品評価技術基盤機構 (NITE) 特許生物寄託センターへの寄託が認められた¹⁾。2003 年には、産業利用のため菌床を使った BX の栽培方法が確立されたことで、市場への流通が可能となった。一般成分として多糖類のひとつである β グルカンをはじめとする食物繊維が豊富に含まれている (乾燥粉末 100 g 中に食物繊維 32.7 g (内、 β -グルカン 13.5 g))。

BX 粉末がもつ大きな特徴のひとつに、生体脂質を酸化して脂質過酸化物の生成を促し、動脈硬化のリスクを高めるヒドロキシラジカルを消去する強力な抗酸化作用がある²⁾。マウスモデルを用いた試験では、BX 粉末が、血液や肝臓中の脂質過酸化物の生成を抑制することが示されている³⁾。また、肥満ラットを用いた抗肥満試験では、肥満群と比べて、BX 乾燥粉末を混餌した肥満ラットの群の体重増加、脂質代謝異常、脂肪肝が有意に改善することが示されている^{4, 5)}。これらのことから、BX が生活習慣病・非アルコール性脂肪性肝疾患を予防する有用なツールとなることが期待されている。BX にはこれらの作用の関与成分として 4- (2-ホルミル-5-ヒドロキシメチル-ピロール-1-イル)-酪酸が含まれていることが示されている¹⁾。

今回は、健康者の中でも BMI、体脂肪率、コリンエステラーゼ (cholinesterase: ChE)、トリグリセリド (triglyceride: TG) が高めの者を対象として、BX の効果と安全性について、層別無作為化二重盲検並行群間比較試験および安全性評価試験を施行した。

方法

対象

被験者は同意取得時点での年齢が 40 歳以上 65 歳以下の健康な男女とした。臨床試験ボランティア会登録者に対

し、被験者募集時に電話での聞き取り調査を行い、試験対象者に該当する 114 名に対して事前検査 & 摂取前 (SCR & Visit-1) を行い、選択基準に該当し、以下に記載の除外基準に抵触しておらず、試験責任医師の判断により試験参加が妥当と判断された者の中より、体格指数 (body mass index: BMI)、体脂肪率、ChE、TG のランキング付けを行い、総合ランキングの高い順に 48 名 (男性: 24 名、女性: 24 名) を選抜し本試験の被験者とした。

除外基準:

- 1) 現在、何らかの疾患を患い薬物治療を受けている者
- 2) 精神疾患、睡眠障害、高血圧、糖尿病、脂質異常症や重篤な疾患の既往歴・現病歴のある者
- 3) 過去 1 ヶ月において、疾患治療を目的とした、薬物の服薬習慣のある者 (頭痛、月経痛、感冒などの頓服歴は除く)
- 4) 肝、腎、心、肺、血液等の重篤な障害の既往歴・現病歴のある者
- 5) 消化器官に重篤な併存疾患および既往歴のある者 (胃・十二指腸潰瘍、過敏性腸症候群、胃切除、胃腸縫合術、腸管切除などの胃腸管部位に大きな手術歴のある者)
- 6) 過去 1 ヶ月間において 200 mL、又は 3 ヶ月以内に 400 mL を超える献血等をした者
- 7) 過去に採血によって気分不良や体調悪化を経験したことのある者
- 8) 高度の貧血がある者
- 9) 試験食品にアレルギー症状を起こす恐れのある者、また、その他食品、医薬品に重篤なアレルギー症状を起こす恐れのある者
- 10) 日常的な飲酒量が 1 日あたり平均アルコール換算で 40 g/日 (ビール 500 ml \times 2 本あるいは日本酒 2 合程度) を超える者
- 11) 喫煙本数が 1 日当たり平均 20 本を越える者
- 12) 試験期間中、生活習慣を変更する可能性のある者 (長期の旅行など)
- 13) 妊娠中、授乳中あるいは妊娠の可能性のある者

- 14) 現在、他ヒト臨床試験に参加している者、他ヒト臨床試験参加後、3ヶ月間が経過していない者
 15) 本人または家族が健康・機能性食品および化粧品を開発・製造もしくは販売する企業にお勤めの者
 16) その他、試験責任医師が本試験の対象として不適当と判断した者

試験期間中は以下の事項を注意事項として被験者に遵守させた。1) 暴食や過激な運動、睡眠不足を避ける、2) 採血実施の12時間前から検査終了まで絶食とする(飲水は可)、3) 検査前日から、検査終了まで禁酒とする、4) 生活習慣を変えない、5) 新たな健康食品の摂取をしない。

試験品

今回の試験食品は、有効性を確認するため通常用量であるBX乾燥粉末を1粒当たり50mg含んだもの(常用量)と、通常用量の10分の1である5mg(低用量)、安全性の確認のため通常用量の5倍にあたる250mg(5倍量)含んだものと、それぞれとの比較のためBX乾燥粉末を全く含んでいないプラセボ食品の4種とした。被験者各人は、割り当てられた被験食品を、1日に6粒摂取する。したがって被験者は、プラセボを除き被験食品(低用量、常用量、5倍量)により、1日にBX粉末をそれぞれ30, 300または1,500mg摂取することとした。

各組成および栄養成分を **Table 1, 2** に示した。試験品および対照品はマイコロジーテクノ株式会社より提供された。

試験デザイン

試験はプラセボを対照とした層別無作為化二重盲検並行群間比較試験とした。但し層別因子は年齢、性別、BMIとした。割付責任者はスクリーニングで選別された48名を無作為に4群に分け、BX配合食品(低用量)群(BX-L)、BX配合食品(常用量)群(BX-N)、BX配合食品(5倍量)群(BX-5)プラセボ食品群(対照:Control)の4群とした。割付表はキーオープンまで封緘保管した。試験品の摂取期間は12週間とし、摂取前(0週)、摂取6週目、摂取終了時(12週)に主要評価項目の血液検査、基本測定(体組成測定、血圧測定)および医師問診による調査を実施した。また摂取前(0週)と摂取終了時(12週)に抗加齢QOL共通問診票(Anti-Aging QOL Common Questionnaire)^{6,7)}と安全性評価項目の血液・尿検査を実施した。摂取期間中は毎日、日誌を記録させた。試験期間は2018年8月から2018年12月とした。

主要評価項目

BX-N群における摂取前後のアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ(AST)、アラニンアミノトランスフェラーゼ(ALT)、 γ -グルタミルトランスぺプチダーゼ(γ -GTP)、

Table 1. Composition of a single dose

Component	BX-L	BX-N	BX-5	Control
<i>Basidiomycetes-X</i> (BX)	5.0	50.0	250.0	-
Food color	-	-	-	15.0
Crystalline cellulose	30.0	30.0	30.0	30.0
Lactose	108.1	93.1	13.1	120.0
Dextrin	150.0	120.0	-	128.1
Hydroxypropyl cellulose (HPC)	0.9	0.9	0.9	0.9
Calcium stearate	3.0	3.0	3.0	3.0
Silicon dioxide (fine particle)	3.0	3.0	3.0	3.0

Values indicate mg

Table 2. Nutrient composition per 100 g.

Nutrient	BX-L	BX-N	BX-5	Control
Energy (kcal)	287	290	292	300
Protein (g)	0.9	1.8	7.8	1.1
Fat (g)	0.5	0.5	0.8	0.6
Carbohydrate (g) (DF + others)	69.7	69.6	63.4	72.6
Na (mg)	14.0	14.0	17.0	42.0

DF, dietary fiber. Others include sugar and starch.

アルカリフォスファターゼ (ALP)、乳酸脱水素酵素 (LDH)、ChE とした。自覚症状の評価として抗加齢 QOL 共通問診票^{6,7)}を実施した。

安全性評価項目

BX-L, BX-N, BX-5 群における摂取前後の血圧 / 脈拍、体重 / 体脂肪率 / BMI、血液学的検査、生化学的検査、尿検査、医師問診有害事象判定とした。血液学的検査項目を以下に示す：白血球数、赤血球数、ヘモグロビン、ヘマトクリット、赤血球恒数 (MCV, MCH, MCHC)、血小板数。生化学検査項目を以下に示す：総蛋白 (TP)、アルブミン定量 (ALB)、尿素窒素 (BUN)、クレアチニン (CRE)、総コレステロール (TC)、TG、LDL-C、HDL-C、FPG、HbA1c [NGSP]、尿検査項目を以下に示す：潜血反応、ブドウ糖定性、蛋白質。

・身体計測

身体計測としては身長、体重、血圧 (収縮期 / 拡張期)、脈拍数を計測した。身体組成検査は体組成計 RD-503 (株式会社タニタ、東京都板橋区) を用いた。

・医師問診有害事象判定

被験者の自覚症状、他覚所見および尿検査、臨床検査値の異常変動としての有害事象は、試験責任医師が判断した。

統計解析

被験者背景は平均値 ± 標準偏差、評価項目は平均値 ± 標準誤差で示した。群内比較は、摂取前と各検査時の比較を対応のある t-検定で統計解析を行った。分類評価ならびにアンケート調査によって得られるスコアは、ノンパラメトリックとして取り扱い、群内での比較には Wilcoxon 符号付順位検定を行った。群間比較は、各検査時の BX-N 群と対照群の比較を対応のない t-検定 (両側検定) で統計解析を行った。分類評価ならびにアンケート調査によって得られるスコアは、ノンパラメトリックとして取り扱い、群間での比較には Wilcoxon 順位和検定を行った。統計解析は、JMP (JMP 13: SAS Institute Japan 株式会社、東京都港区) を用いて実施し、有意水準は両側検定で 5% 未満とした。

倫理指針

本試験は、ヘルシンキ宣言 (2013 年 WMA フォルタレザ総会で修正) および人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (文部科学省、厚生労働省告示) に遵守した。被験者の人権および安全性と試験データの信頼性の確保を図るため、一般社団法人糖化ストレス研究会「人を対象とする研究」に関する倫理審査委員会での審議、承認の下に実施された (承認番号: 糖ス倫 2018 第 005 号)。本試験は大学病院医療情報ネットワーク臨床試験登録システム

(UMIN-CTR) に事前登録の上、実施された (登録番号: UMIN 000033706)。

結果

試験完遂状況

本試験は各群 12 名、計 48 名で試験開始したが、BX-L 群で 1 名、自己都合による 12 週検査未受診が生じた。試験対象者数の推移を Fig. 1 に示した。試験実施計画書で規定の通り、本試験とは無関係の事由で止むを得ず一部のデータの採取が不可能となった場合で、欠損データとして処理した。よって全 48 例を有効性解析 (PPS 解析) の対象とした。

主要評価項目

BX-N 群と対照群 (control) における結果を Table 3、Fig. 2 に示した。BX-N 群では、AST が摂取前 (24.8 ± 1.5 U/L) に比較して摂取 12 週後 (22.0 ± 1.7 U/L) で有意に減少 ($p = 0.015$)、LDH が摂取前 (195.3 ± 10.9 U/L) に比較して摂取 6 週後 (185.1 ± 9.3 U/L)、12 週後 (173.8 ± 10.5 U/L) で有意に減少した ($p = 0.007$, $p < 0.001$)。AST の 12 週後変化量は BX-N 群の減少量が対照群に比べて大きく、群間有意差を認めた ($p = 0.031$, Fig. 2-a)。γ-GTP、ALP、ChE には有意な変化は認められなかった。抗加齢 QOL 共通問診票スコアについては有意な変化は認められなかった。

安全性評価項目

安全性評価については、有害事象は 3 例 4 件報告されたが、その症状はいずれも一過性の症状や外的要因の症状であった。試験との因果関係および試験食品との因果関係は認められなかった。その他の安全性評価項目の結果を Table 4, 5, 6 に示した。

12 週後の体脂肪については、BX-L 群で変化なし (+2.9%, $p > 0.05$)、BX-N 群で有意に増加 (+1.9%, $p = 0.003$)、BX-5 群で有意に増加 (+2.8%, $p = 0.001$)、対照群で有意に増加 (+1.8%, $p = 0.024$) であったが、群間有意差は認めなかった。

収縮期血圧は、BX-L 群で有意に増加 (+7.0%, $p = 0.027$)、BX-N 群で変化なし (+5.6%, $p > 0.05$)、BX-5 群で変化なし (+7.0%, $p > 0.05$)、対照群で変化なし (+1.7%, $p > 0.05$) であったが、群間有意差は認めなかった。

拡張期血圧は BX-L 群で有意に増加 (+6.0%, $p = 0.035$)、BX-N 群で有意に増加 (+6.6%, $p = 0.024$)、BX-5 群で変化なし (+2.9%, $p > 0.05$)、対照群で変化なし (+2.9%, $p > 0.05$) であったが、群間有意差は認めなかった。

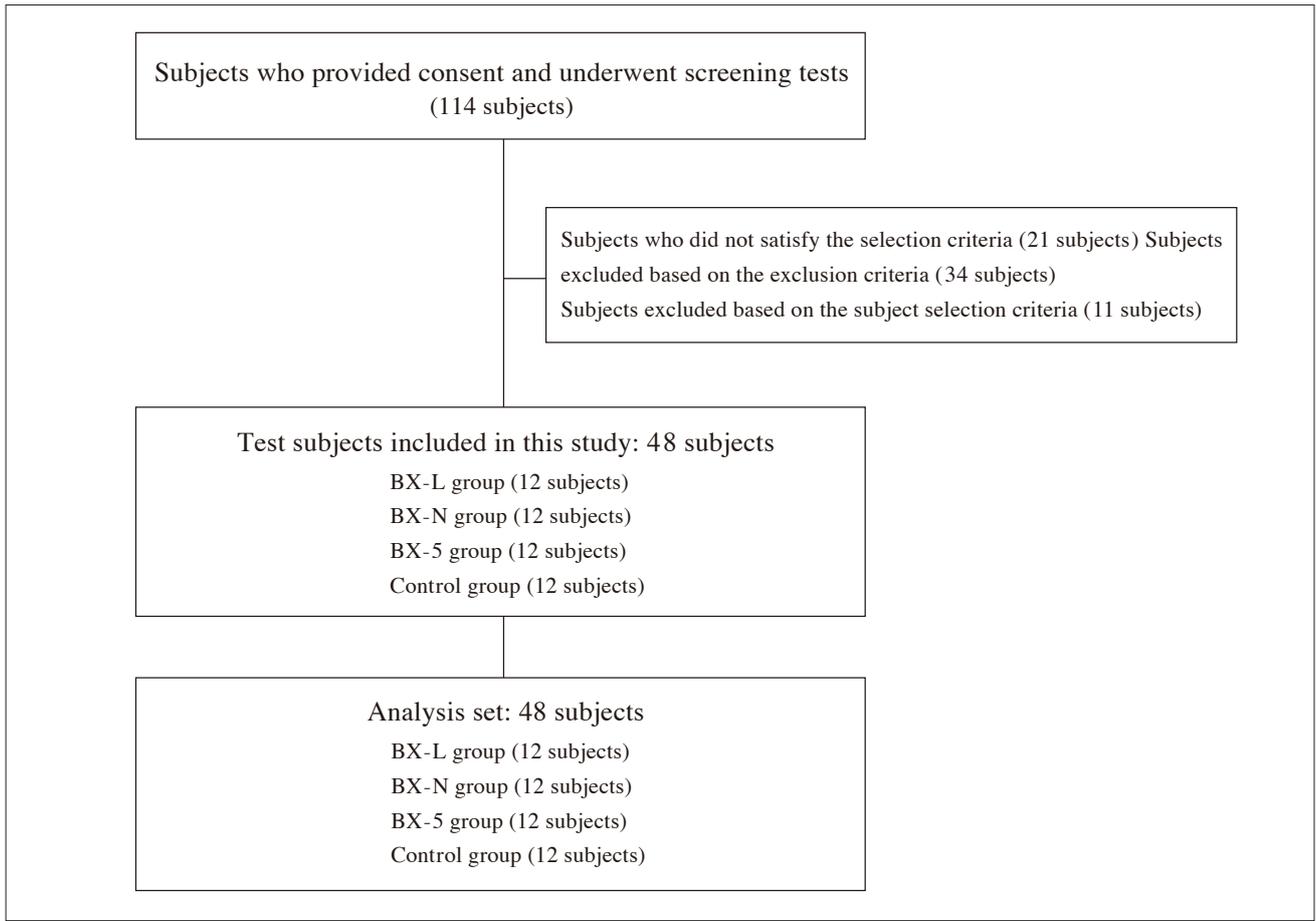


Fig. 1. Flow chart of the clinical trial.

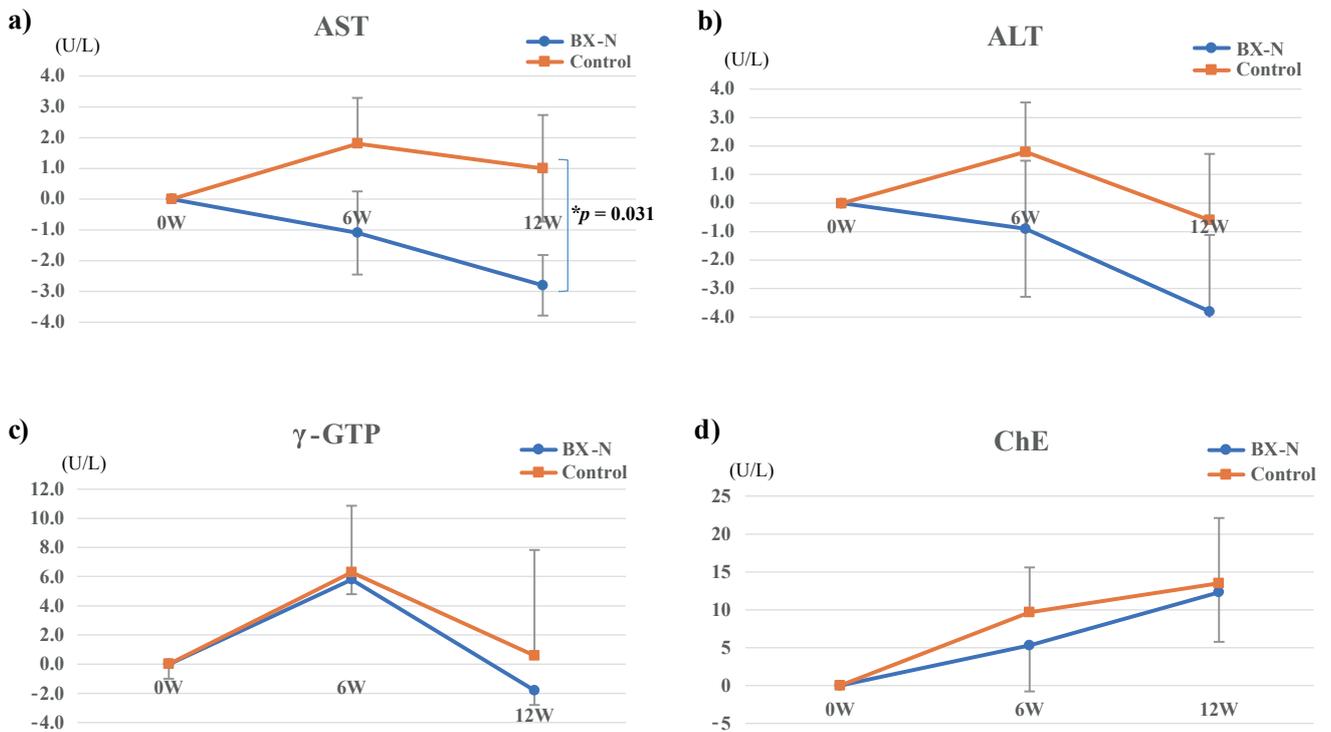


Fig. 2. Changes in serum markers of liver function.

a) AST, b) ALT, c) γ-GTP, d) ChE. Results are expressed as mean ± SEM, n = 12, Wilcoxon test. AST, aspartate aminotransferase; ALT, alanine aminotransferase; γ-GTP, γ-glutamyl transpeptidase; ChE, cholinesterase; SEM, standard error of the mean.

Table 4. Anthropometry.

Item	Unit	Group	0 weeks	6 weeks	p value	12 weeks	p value
Height	cm	BX-L	162.98 ± 2.76	- ± -	-	- ± -	-
		BX-N	164.25 ± 2.38	- ± -	-	- ± -	-
		BX-5	165.03 ± 2.44	- ± -	-	- ± -	-
		Control	162.67 ± 2.43	- ± -	-	- ± -	-
Weight	kg	BX-L	69.8 ± 3.4	69.9 ± 3.4	0.796	69.7 ± 3.6	0.855
		BX-N	72.1 ± 3.2	72.6 ± 3.1	0.006**	72.1 ± 3.1	0.901
		BX-5	72.2 ± 2.2	71.9 ± 2.4	0.258	72.5 ± 2.3	0.211
		Control	70.6 ± 2.9	70.7 ± 3.0	0.679	70.7 ± 3.0	0.670
Body fat	%	BX-L	30.8 ± 1.7	30.9 ± 1.7	0.697	31.7 ± 1.8	0.332
		BX-N	32.1 ± 1.8	32.0 ± 1.8	0.982	32.7 ± 1.9	0.003**
		BX-5	31.9 ± 1.9	32.5 ± 1.9	0.006**	32.8 ± 1.9	0.001**
		Control	32.9 ± 1.7	33.3 ± 1.8	0.085	33.5 ± 1.7	0.024*
BMI	-	BX-L	26.1 ± 0.6	26.1 ± 0.6	0.914	26.2 ± 0.6	0.887
		BX-N	26.6 ± 0.6	26.8 ± 0.6	0.007**	26.6 ± 0.6	0.893
		BX-5	26.4 ± 0.3	26.3 ± 0.3	0.213	26.6 ± 0.3	0.267
		Control	26.6 ± 0.6	26.6 ± 0.6	0.857	26.6 ± 0.6	0.791
Blood pressure (systolic)	mmHg	BX-L	122.2 ± 3.7	129.0 ± 4.8	0.038*	130.8 ± 5.6	0.027*
		BX-N	127.7 ± 3.5	133.4 ± 4.3	0.153	134.8 ± 4.3	0.054
		BX-5	122.0 ± 3.3	128.9 ± 2.9	0.032*	130.6 ± 4.6	0.064
		Control	125.7 ± 4.2	131.6 ± 4.0	0.049*	127.8 ± 5.5	0.670
(diastolic)	mmHg	BX-L	80.3 ± 3.1	81.6 ± 3.0	0.524	85.1 ± 3.4	0.035*
		BX-N	82.4 ± 2.2	85.4 ± 3.1	0.209	87.8 ± 3.3	0.024*
		BX-5	79.4 ± 1.9	83.7 ± 2.6	0.034*	84.7 ± 4.0	0.168
		Control	80.6 ± 2.6	83.4 ± 3.0	0.035*	82.9 ± 3.1	0.208
Pulse	/min	BX-L	72.7 ± 1.7	72.5 ± 2.7	0.939	74.5 ± 3.0	0.600
		BX-N	72.6 ± 2.1	75.9 ± 2.2	0.167	74.7 ± 2.8	0.357
		BX-5	73.2 ± 1.9	72.6 ± 2.4	0.725	69.9 ± 2.6	0.054
		Control	73.8 ± 3.1	70.9 ± 2.2	0.068	75.0 ± 2.5	0.480

Data are expressed as mean ± SEM, paired t test, n = 12. BMI, body mass index; SEM, standard error of the mean.

Table 5. Blood chemistry.

Item	Unit	Group	0 weeks	12 weeks	p value
AST	U/L	BX-L	21.3 ± 1.9	19.0 ± 1.0	0.360
		BX-N	24.8 ± 1.5	22.0 ± 1.7	0.015*
		BX-5	21.7 ± 1.4	20.5 ± 0.9	0.284
		Control	21.6 ± 1.3	22.6 ± 2.1	0.575
ALT	U/L	BX-L	21.7 ± 3.1	17.5 ± 1.8	0.134
		BX-N	29.0 ± 3.8	25.3 ± 3.4	0.190
		BX-5	22.2 ± 3.0	20.2 ± 1.3	0.433
		Control	21.5 ± 2.9	20.9 ± 3.4	0.807
γ-GTP	U/L	BX-L	30.3 ± 4.7	25.9 ± 3.6	0.605
		BX-N	54.6 ± 13.3	52.8 ± 16.5	0.713
		BX-5	52.9 ± 18.5	51.2 ± 18.6	0.912
		Control	58.8 ± 16.2	59.4 ± 15.0	0.937
ALP	U/L	BX-L	204.5 ± 13.2	206.9 ± 13.4	0.971
		BX-N	205.0 ± 17.7	202.0 ± 19.0	0.570
		BX-5	187.6 ± 12.7	206.3 ± 16.2	0.134
		Control	222.2 ± 11.5	220.9 ± 9.3	0.874
LDH	U/L	BX-L	197.7 ± 10.2	179.5 ± 6.7	0.012*
		BX-N	195.3 ± 10.9	173.8 ± 10.5	< 0.001**
		BX-5	178.2 ± 5.6	167.3 ± 5.5	0.020*
		Control	195.3 ± 10.5	172.6 ± 8.7	< 0.001**
ChE	U/L	BX-L	358.8 ± 15.6	367.9 ± 19.1	0.210
		BX-N	379.8 ± 11.1	392.1 ± 11.3	0.086
		BX-5	378.6 ± 10.6	385.4 ± 15.8	0.577
		Control	386.0 ± 20.7	399.5 ± 17.2	0.145
TG	mg/dL	BX-L	136.7 ± 21.7	115.5 ± 22.3	0.361
		BX-N	145.1 ± 17.3	121.2 ± 8.4	0.047*
		BX-5	191.4 ± 33.3	158.2 ± 33.9	0.137
		Control	180.2 ± 20.0	155.1 ± 24.1	0.201
LDL-C	mg/dL	BX-L	134.2 ± 7.2	142.3 ± 9.2	0.436
		BX-N	149.7 ± 6.9	150.7 ± 7.5	0.755
		BX-5	134.8 ± 8.6	136.6 ± 8.6	0.843
		Control	147.3 ± 10.0	144.0 ± 7.6	0.645
TC	mg/dL	BX-L	223.1 ± 8.2	231.3 ± 9.3	0.351
		BX-N	238.4 ± 9.1	235.3 ± 9.4	0.458
		BX-5	218.3 ± 9.0	214.9 ± 9.7	0.740
		Control	234.3 ± 10.0	225.5 ± 8.6	0.227
HDL-C	mg/dL	BX-L	59.2 ± 6.4	68.3 ± 7.2	0.014*
		BX-N	60.5 ± 3.2	62.6 ± 3.3	0.086
		BX-5	51.1 ± 3.8	51.8 ± 3.3	0.749
		Control	53.3 ± 4.2	55.8 ± 4.5	0.061

Data are expressed as mean ± SEM, paired t test, n = 12. AST, aspartate aminotransferase; ALT, alanine aminotransferase; γ-GTP, γ-glutamyl transpeptidase; ALP, alkaline phosphatase; LDH, lactate dehydrogenase; ChE, cholinesterase; TG, triglycerides; LDL-C, low-density lipoprotein-C; TC, total cholesterol; HDL-C, high-density lipoprotein-C; SEM, standard error of the mean.

Table 6. Complete blood count and blood chemistry.

Item	Unit	Group	0 weeks	12 weeks	p value
WBC	/μL	BX-L	6500.0 ± 302.3	6563.6 ± 284.5	0.726
		BX-N	5350.0 ± 308.1	5325.0 ± 341.6	0.901
		BX-5	5675.0 ± 235.8	5850.0 ± 291.9	0.321
		Control	5933.3 ± 185.2	6266.7 ± 468.9	0.434
RBC	×10 ⁴ /μL	BX-L	477.5 ± 11.1	480.6 ± 13.7	0.415
		BX-N	472.0 ± 10.8	476.3 ± 10.3	0.316
		BX-5	463.6 ± 7.5	471.3 ± 8.3	0.300
		Control	479.2 ± 10.5	478.9 ± 11.3	0.972
Hb	g/dL	BX-L	14.22 ± 0.31	14.27 ± 0.36	0.629
		BX-N	14.37 ± 0.35	14.43 ± 0.33	0.626
		BX-5	14.18 ± 0.29	14.33 ± 0.34	0.555
		Control	14.50 ± 0.41	14.38 ± 0.46	0.609
Ht	%	BX-L	45.27 ± 0.79	44.21 ± 0.94	0.091
		BX-N	45.23 ± 0.96	44.20 ± 0.84	0.018*
		BX-5	44.78 ± 0.71	43.98 ± 0.70	0.278
		Control	45.76 ± 1.09	44.35 ± 1.05	0.059
MCV	fL	BX-L	95.0 ± 1.1	92.2 ± 1.1	< 0.001**
		BX-N	95.9 ± 0.8	92.8 ± 0.8	< 0.001**
		BX-5	96.8 ± 0.9	93.4 ± 1.0	< 0.001**
		Control	95.7 ± 1.2	92.8 ± 1.5	< 0.001**
MCH	pg	BX-L	29.81 ± 0.36	29.76 ± 0.39	0.434
		BX-N	30.44 ± 0.36	30.29 ± 0.33	0.296
		BX-5	30.59 ± 0.40	30.39 ± 0.42	0.082
		Control	30.25 ± 0.43	30.00 ± 0.59	0.213
MCHC	%	BX-L	31.39 ± 0.27	32.28 ± 0.21	< 0.001**
		BX-N	31.74 ± 0.22	32.60 ± 0.23	< 0.001**
		BX-5	31.65 ± 0.22	32.53 ± 0.32	< 0.001**
		Control	31.67 ± 0.23	32.33 ± 0.34	0.031*
TP	g/dL	BX-L	7.25 ± 0.10	7.25 ± 0.15	0.603
		BX-N	7.28 ± 0.08	7.33 ± 0.09	0.429
		BX-5	7.19 ± 0.14	7.21 ± 0.15	0.889
		Control	7.45 ± 0.12	7.40 ± 0.13	0.590
ALB	g/dL	BX-L	4.26 ± 0.07	4.37 ± 0.07	0.108
		BX-N	4.39 ± 0.04	4.48 ± 0.05	0.075
		BX-5	4.28 ± 0.07	4.34 ± 0.09	0.368
		Control	4.34 ± 0.08	4.41 ± 0.07	0.347
BUN	mg/dL	BX-L	12.02 ± 0.58	12.34 ± 0.46	0.396
		BX-N	14.00 ± 1.29	15.77 ± 1.06	0.019*
		BX-5	13.62 ± 1.02	13.51 ± 0.82	0.910
		Control	12.95 ± 0.56	13.73 ± 0.86	0.299
CRE	mg/dL	BX-L	0.743 ± 0.044	0.743 ± 0.040	0.061
		BX-N	0.811 ± 0.051	0.879 ± 0.050	0.011*
		BX-5	0.728 ± 0.040	0.778 ± 0.038	0.007**
		Control	0.768 ± 0.034	0.818 ± 0.041	0.025*
FPG	mg/dL	BX-L	81.0 ± 1.2	81.8 ± 1.7	0.578
		BX-N	84.5 ± 2.4	88.2 ± 2.7	0.033*
		BX-5	81.6 ± 1.8	81.5 ± 1.9	0.938
		Control	84.1 ± 2.0	83.8 ± 2.5	0.868
HbA1c [NGSP]	%	BX-L	5.67 ± 0.09	5.48 ± 0.08	< 0.001**
		BX-N	5.61 ± 0.06	5.48 ± 0.07	0.018*
		BX-5	5.57 ± 0.06	5.43 ± 0.07	0.003**
		Control	5.63 ± 0.06	5.48 ± 0.05	< 0.001**

Data are expressed as mean ± SEM, paired t test, n = 12. WBC, white blood cell; RBC, red blood cell; Hb, hemoglobin; Ht, hematocrit; MCV, mean corpuscular volume; MCH, mean corpuscular hemoglobin; MCHC, mean corpuscular hemoglobin concentration; TP, total protein; ALB, albumin; BUN, urea nitrogen; CRE, creatinine; FPG, fasting plasma glucose; HbA1c hemoglobin A1c; NGSP, National Glycohemoglobin Standardization Program; SEM, standard error of the mean.

考察

今回の臨床試験は、動物実験で肝機能改善効果が確認された BX 乾燥粉末が、第一としてヒトにおいても同様に肝機能改善効果を検証できるか否か、第二として常用量の 5 倍量の BX 乾燥粉末を摂取した時の安全性を評価することが目的である。方法として ChE、AST、ALT が高めの者を対象として層別無作為化二重盲検並行群間比較試験を施行した。

常用量 BX による肝機能改善効果

肝機能指標 (AST, ALT, γ -GTP) は対照群には有意な変動がなかったが、BX を投与した BX-L、BX-N、BX-5 群ともに改善方向への変動を示している。特に BX-N 群では 12 週後の AST 変化に群間有意差を認めた。

用量依存性の有無をみると、対照群、BX-L 群、BX-N 群との間に AST、ALT、 γ -GTP のいずれも用量依存性の作用を認めている。BX-5 群では γ -GTP のみ BX-N 群と同程度の効果を示したが、AST、ALT では BX-N 群よりも効果が弱い傾向がみられた。BX 摂取による有害事象は認められなかった。以上の結果より、常用量 BX 含有品を摂取することにより効率よく肝機能改善効果が得られると判断した。

ChE は脂肪肝の指標であり、今回の試験では試験参加者スクリーニングに用いた。ChE が高値であるほど脂肪肝の進展が示唆される。今回の結果では、対照群に比べて BX-L 群、BX-5 群で改善する傾向がみられたが、群間有意差、用量依存性はみられなかった。

肥満ラットを用いた抗肥満試験では、BX 乾燥粉末を混餌した肥満ラットの群の体重増加、脂肪肝が有意に改善することが示されている^{4, 5}。ヒトにおいても動物実験と同様に、高用量 BX 投与 (BX-5 群) で脂肪肝が改善した可能性がある。

試験品の主成分は BX 粉末であり、有効成分として 4-(2-ホルミル-5-ヒドロキシメチル-ピロール-1-イル)-酪酸、および、同化合物中のカルボン酸がカルボン酸アミドに変換された構造をもつ新規抗酸化物質が含まれている^{1, 2}。BX 粉末がもつ大きな特徴のひとつに、ヒドロキシラジカルを消去する強力な抗酸化作用がある^{1, 2}。4-(2-ホルミル-5-ヒドロキシメチル-ピロール-1-イル)-酪酸が、肝臓保護作用をもつことが示されている⁸。肝臓保護作用の作用機序の一つとしては抗酸化作用の関与が考えられる。著者らが以前に行ったアスタキサンチンの臨床試験においても AST の有意な改善が認められた⁹。抗酸化作用により、血液や肝臓中の脂質過酸化物の生成が抑制されたことにより肝細胞への負荷が軽減し、AST・ALT といった酵素逸脱が改善されたものと推測している。

安全性評価

BX は食経験が十分にある食用キノコである。これまで

に BX 摂取に起因する有害事象の報告はなく、安全性の高い食材と言える。ここでは今回の試験でみられた体重、体脂肪率の変動結果について考察する。

肥満ラットを用いた抗肥満試験では、BX 乾燥粉末を混餌した群で体重増加の有意な抑制作用がみられた^{4, 5}。しかし今回はいずれの群においても体重抑制作用は確認できなかった。体脂肪率は対照、BX-L、BX-N の 3 群で有意に増加していたが、対照との群間有意差はなかった。体脂肪率については季節変動がみられることが知られている^{10, 11}。2004 年夏～2011 年冬までの 7 年間にわたり、石川県在住の健常高齢者 (女性 22 名、男性 17 名、平均 70.7 ± 3.2 歳) を対象とする縦断研究では、体脂肪率は夏期よりも冬期の方が高値であった¹²。女子学生を対象に海外と比較した成績では、体脂肪率の季節変動は日本、タイ、ポーランドにおいても同様に認められた^{13, 14}。

今回の試験における体脂肪率の変化は、BX を摂取した 3 群で +1.9 ~ 2.9%、対照群でも +1.8% と軽微な変化が見られており、季節変動の範囲内と考えられる。よって BX の安全性に関して問題は無いと判断した。

次に血圧変動について考察する。BX 乾燥粉末に含まれる 4-(2-ホルミル-5-ヒドロキシメチル-ピロール-1-イル)-酪酸などの機能性成分は抗酸化作用を有する。一般的に血管平滑筋は内皮細胞由来の一酸化窒素 (nitric oxide: NO) により拡張しフリーラジカルや活性酸素種 (reactive oxygen species: ROS) により収縮することから、抗酸化物質は血管壁の緊張を緩和し、高圧作用を発揮する機会が多い¹⁵⁻¹⁷。これまでの行った臨床試験においてもアスタキサンチン⁹ やカシス由来アントシアニン¹⁸ の摂取により血圧の有意な低下を認めている。従って今回の試験においても BX 摂取により血圧が低下する方向に作用するのではないかと予想した。BX 中の成分については自律神経に影響を及ぼす可能性のある成分は含まれておらず、交感神経や副交感神経活動を介して血圧に影響する可能性は低い。しかし、血圧の変動をみると収縮期血圧は BX-L 群で有意に増加、拡張期血圧は BX-L、BX-N 群で有意に増加していた。

そこで考えたのは気候の影響である。一般的に外気温が低下する冬季には心血管イベントが増え、死亡率が増加する¹⁹⁻²¹。血圧は夏に低くなり冬に高くなる季節変動を示し、これには年齢、性別、肥満度など様々な因子が影響する²²。

今回の試験日は 0 週 (試験前): 9 月 3 日 (午前 10 時 29.6°C、最高 34.1°C、最低 23.4°C)、6 週: 10 月 26 日 (午前 10 時 19.5°C、最高 25.3°C、最低 12.6°C)、12 週: 12 月 7 日 (午前 10 時 14.2°C、最高 15.7°C、最低 12.0°C) であった。0, 6 週に比べ 12 週測定日は明らかに寒く、血圧が高めに偏移していた可能性が高い。

気温変動は血圧モーニングサージ (morning blood pressure surge: MBPS) にも影響する。MBPS とは、心血管疾患の発症は午前中に多いことから^{23, 24}、心血管疾患

の発症や予後と関連する血圧サーカディアン変動の指標として提唱され概念で、起床前後2時間の血圧上昇から求めた pre-waking MBPS²⁵⁾ や夜間最低血圧から早朝2時間までの血圧上昇を示す sleep-trough MBPS²⁶⁾ がある。

Saeki Kらは、平均32.0歳の健康対象者146名を室温は14°Cの寒冷曝露群(76名)と24°Cの対照群(70名)の2群に分け、対象者に就寝前2時間から起床後2時間まで、衣類の量は自由に調整できるように準備し居室させ、15間隔で血圧を測定、算出したMBPSを2群間で比較している²⁷⁾。その結果、寒冷曝露群では対照群に比べて着衣量が増えたにもかかわらず、sleep-trough MBPSは7.2 mmHg(95%信頼区間:3.9~10.5)、pre-waking MBPSは5.2 mmHg(95%信頼区間:2.1~8.2)有意に上昇した。本研究においても収縮期血圧(平均値)に7.1~8.4 mmHgの増加がみられ、MBPSと同程度であることから、「血圧上昇の原因が寒冷曝露である」との推論と相反しない。

本試験の血圧上昇の要因として外気温の低下といった季節変動の要因が大きいと考えられる。今回の所見は、変動範囲が生理的範囲内であったこと、高用量BX-5群では血圧に影響がなかったこと、群間解析では対照群と群間有意差がなく、血圧上昇の要因として外気温の低下といった季節変動の要因が大きく、BX抽出に関して安全上問題ないと判断した。

低温耐性への影響の可能性

血圧増加の程度については群による差があった。収縮期血圧はBX-L群で12週後に有意に増加、拡張期血圧はBX-L、BX-N群で有意に増加していたが、対照群およびBX-5群では有意差はなかった。これらの現象を説明する仮説として、BX乾燥粉末による寒冷環境への耐性が変化した可能性について考える。

血圧は外気温が高い夏に低く、外気温が低い冬に高くなることは既に述べた。外気温と室内温の差が大きく影響し、同じ外気温の日であっても室温が低いと血圧は上昇する²²⁾。

今回の試験中は室温については規定がなく、被験者各自の裁量にゆだねられた。寒く感じれば室温を高く設定するであろうし、さほど寒く感なければ室温を高める必要はないであろう。そこで考えたのが、BX摂取により低温環境に対する適応力(低温耐性)が高まり、室温を高める必要がなくなった可能性である。

低温耐性が生じる機序の一つに褐色脂肪組織(brown adipose tissue: BAT)量の増加が挙げられる²⁸⁻³⁰⁾。BATは低温下での体温維持に寄与する高い熱産生能を有する脂肪組織であり、その活性強度が成人の肥満度と逆相関することが示されている³¹⁾。

熱産生脂肪組織にはBATとベージュ脂肪組織の2種があることが近年明らかにされた。その両者が全身のエネルギー代謝制御の重要な役割を担っている。恒温動物が寒冷

環境に曝されると、交感神経を介して褐色/ベージュ脂肪組織が急速な熱産生を誘導する。これに伴い脂肪燃焼・熱産生に関わる遺伝子の発現を急速に誘導され、熱産生の能力が高まる。寒冷環境が持続すると、白色脂肪組織(white adipose tissue: WAT)からベージュ脂肪組織へと分化誘導が促される^{32,33)}。この現象はWATの“ベージュ化”ともよばれ、慢性的な寒冷環境に適応する仕組みである。

BATではuncoupling protein-1(UCP1)依存性に熱産生が惹起される。肥満症・2型糖尿病・脂肪肝・高齢者はUCP1の低下要因である^{34,35)}。これらの病態が改善されるとBATの熱産生能は回復する。BATの熱産生増加は、胆汁酸、β3アドレナリン受容体作動薬、温度受容体TRPを刺激するカプサイシン、茶カテキンによっても再現される^{36,37)}。本被験者で肥満・脂肪肝が改善された例では、BATの熱産生能が回復し、寒冷環境への適応能力が改善した可能性が考えられる。

一方、ベージュ脂肪細胞は新規のUCP1非依存的な熱産生経路を有する。ベージュ脂肪細胞を誘導することにより、肥満の抑制、全身の糖・脂質代謝の改善が期待できる。ベージュ脂肪細胞の発生・分化には、転写調節制御因子であるPRDM16や、ヒストン修飾因子であるEHMT1が深くかかわっている。マウスではカゼインキナーゼCK2がベージュ脂肪細胞の分化を抑制する作用があるが、CK2阻害剤を投与すると白色脂肪組織のベージュ化が誘導され、UCP1発現量が上昇し、エネルギー消費量が増加する³⁸⁾。BXに含まれる機能性成分がCK2に及ぼす影響については現在不明であるが、今後の課題である。

結論

本研究ではBX乾燥粉末を用いてBX常用量による効能評価と高用量による安全性評価を並行して行った。BX常用量(BX-N)群では肝機能(AST、LDH)の改善を示し、ASTは対照群に比べて有意に改善した。BX中の機能性成分の抗酸化作用・脂質過酸化抑制作用に基づく脂肪肝の改善作用が示唆された。脂肪肝・肝機能改善を目的とした機能性食品としての役割を果たすと予想される。BXは食経も豊富なキノコであり、高用量(5倍量)BXの12週間によっても有害事象は認められず、BXの安全性が確認された。肝機能改善効果に関する詳細な機序については、今後の検討課題である。

利益相反申告

本研究を施行するにあたりマイコロジーテクノ株式会社(新潟市東区)より支援を受けた。

参考文献

- 1) Konishi T, Watanabe K, Arummugam S, et al. Nutraceutical and therapeutic significance of Echigoshirayukidake (*Basidiomycetes-X*), a novel mushroom found in Niigata, Japan. *Glycative Stress Res.* 2019; 6: 248-257.
- 2) マイコロジエテクノ株式会社, 野本亀久雄, 渡辺哲男. 抗アトピー性疾患組成物. WO2008129996. 2008-10-30.
- 3) Watanabe T, Nakajima Y, Konishi T. *In vitro* and *in vivo* anti-oxidant activity of hot water extract of *basidiomycetes-X*, newly identified edible fungus. *Biol Pharm Bull.* 2008; 31: 111-117.
- 4) マイコロジエテクノ株式会社, 佐藤眞治, 小西徹也, 渡辺哲男. 抗肥満組成物及びこれを用いたサプリメント及び飲料並びに肥満防止方法. 特開 2017-190317. 2016-4-15.
- 5) Sato S, Sakurai M, Konishi T, et al. Anti-obesity effect of Echigoshirayukidake (*Basidiomycetes-X*) in rats. *Glycative Stress Res.* 2019; 6: 198-211.
- 6) Yonei Y, Takahashi Y, Hibino S, et al. Effects on the human body of a dietary supplement containing L-carnitine and *Garcinia cambogia* extract: A study using double-blind tests. *J Clin Biochem Nutr.* 2008; 42: 89-103.
- 7) Oguma Y, Iida K, Yonei Y, et al. Significance evaluation of Anti-Aging QOL Common Questionnaire. *Glycative Stress Res.* 2016; 3: 177-185.
- 8) Chin YW1, Lim SW, Kim SH, et al. Hepatoprotective pyrrole derivatives of Lycium chinense fruits. *Bioorg Med Chem Lett.* 2003; 13: 79-81.
- 9) Iwabayashi M, Fujioka N, Nomoto K, et al. Efficacy and safety of eight-week treatment with astaxanthin in individuals screened for increased oxidative stress burden. *Anti-Aging Med.* 2009; 6: 15-21.
- 10) 田原靖昭. 体組成と寒冷暴露時産熱量の季節変動. 長崎医学会雑誌. 1983; 58: 41-54.
- 11) 高橋かおる, 神野 勉, 野村賢治, 他. 健康診断検査値の季節変動についての検討. 予防医学ジャーナル. 2012; 465: 72-76.
- 12) Kimura T, Kobayashi H, Nakayama E, et al. Seasonality in physical activity and walking of healthy older adults. *Journal of Physiological Anthropology.* 2015; 34(October): 1-6.
- 13) Morinaka T, Wozniwicz M, Jeszka J, et al. Comparison of seasonal variation in the fasting respiratory quotient of young Japanese, Polish and Thai women in relation to seasonal change in their percent body fat. *Journal of Physiological Anthropology.* 2012; 31(May): 1-12.
- 14) Morinaka T, Limtrakul P, Makonkawkeyoon L, et al. Comparison of variations between percentage of body fat, body mass index and daily physical activity among young Japanese and Thai female students. *Journal of Physiological Anthropology.* 2012; 31(August): 1-4.
- 15) Hussein G, Nakamura M, Zhao Q, et al. Antihypertensive and neuroprotective effects of astaxanthin in experimental animals. *Biol Pharm Bull.* 2005; 28: 47-52.
- 16) Hussein G, Goto H, Oda S, et al. Antihypertensive potential and mechanism of action of astaxanthin: II. Vascular reactivity and hemorheology in spontaneously hypertensive rats. *Biol Pharm Bull.* 2005; 28: 967-971.
- 17) Hussein G, Goto H, Oda S, et al. Antihypertensive potential and mechanism of action of astaxanthin: III. Antioxidant and histopathological effects in spontaneously hypertensive rats. *Biol Pharm Bull.* 2006; 29: 684-688.
- 18) Yonei Y, Iwabayashi M, Fujioka N, et al. Evaluation of effects of cassis (*Ribes nigrum* L.) juice on human vascular function and gene expression using a microarray system. *Anti-Aging Medicine.* 2009; 6: 22-31.
- 19) Curwen M. Excess winter mortality: A British phenomenon? *Health Trends 1990/1991;* 22: 169-175.
- 20) Healy JD. Excess winter mortality in Europe: A cross country analysis identifying key risk factors. *J Epidemiol Community Health.* 2003; 57: 784-789.
- 21) The Eurointer group. Cold exposure and winter mortality from ischaemic heart disease, cerebrovascular disease, respiratory disease, and all causes in warm and cold regions of Europe. *Lancet* 1997; 349: 1341-1346.
- 22) 大林賢史, 佐伯圭吾. 温熱・光住環境と血圧サーカディアン変動: 平城京コホート研究からの知見. 日本衛生学雑誌. 2018; 73: 138-142.
- 23) Stergiou GS, Vemmos KN, Pliarchopoulou KM, et al. Parallel morning and evening surge in stroke onset, blood pressure, and physical activity. *Stroke.* 2002; 33: 1480-1486.
- 24) Cohen MC, Rohtla KM, Lavery CE, et al. Meta-analysis of the morning excess of acute myocardial infarction and sudden cardiac death. *Am J Cardiol.* 1997; 79: 1512-1516.
- 25) Metoki H, Ohkubo T, Kikuya M, et al. Prognostic significance for stroke of a morning pressor surge and a nocturnal blood pressure decline: The Ohasama study. *Hypertension.* 2006; 47: 149-154.
- 26) Kario K, Pickering TG, Umeda Y, et al. Morning surge in blood pressure as a predictor of silent and clinical cerebrovascular disease in elderly hypertensives: A prospective study. *Circulation.* 2003; 107: 1401-1406.
- 27) Saeki K, Obayashi K, Iwamoto J, et al. Influence of room heating on ambulatory blood pressure in winter: A randomised controlled study. *J Epidemiol Community Health* 2013; 67: 484-490.
- 28) Saito M, Okamatsu-Ogura Y, Matsushita M, et al. High incidence of metabolically active brown adipose tissue in healthy adult humans: Effects of cold exposure and adiposity. *Diabetes.* 2009; 58: 1526-1531.
- 29) Futawaka K, Tagami T, Fukuda Y, et al. Growth hormone regulates the expression of UCP2 in myocytes. *Growth Horm IGF Res.* 2016; 29: 57-62.
- 30) 二若久美, 森山賢治, 田上哲也. 成長ホルモン、インスリン様成長因子-1による脂肪細胞のベージュ化に関する分子生物学的基盤解明. 成長科学協会研究年報. 2018; 41: 151-157.
- 31) Goto T. A review of the studies on food-derived factors which regulate energy metabolism via the modulation of lipid-sensing nuclear receptors. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2019; 83: 579-588.
- 32) Inagaki T, Sakai J, Kajimura S. Transcriptional and epigenetic control of brown and beige adipose cell fate and function. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2017; 18: 527.
- 33) 酒井寿郎. 肥満・生活習慣病におけるエピゲノム研究. 医学のあゆみ. 2019; 268: 359-364.
- 34) Ikeda K, Kang Q, Yoneshiro T, et al. UCP1-independent signaling involving SERCA2b-mediated calcium cycling regulates beige fat thermogenesis and systemic glucose homeostasis. *Nat Med.* 2017; 23: 1454-1465.

- 35) 池田賢司, 梶村真吾. 肥満症の病態 : 肥満症と褐色脂肪細胞／ベージュ脂肪細胞. 最新医学. 2019; 74: 60-66.
- 36) Saito M. Capsaicin and related food ingredients reducing body fat through the activation of TRP and brown fat thermogenesis. *Adv Food Nutr Res.* 2015; 76: 1-28.
- 37) 斉藤昌之, 松下真美, 米代武司. エネルギー代謝の制御機構 : ヒト褐色脂肪組織の活性化・増量 その評価法と肥満対策への応用. *実験医学.* 2016; 34: 197-202.
- 38) Shinoda K, Ohyama K, Hasegawa Y, et al. Phosphoproteomics identifies CK2 as a negative regulator of beige adipocyte thermogenesis and energy expenditure. *Cell Metab.* 2015; 22: 997-1008.